

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11237

研究課題名(和文) 視床下部-下垂体-性腺軸の中樞制御機構の解明

研究課題名(英文) Central regulation of Hypothalamic-Pituitary Gonadal axis

研究代表者

金崎 春彦 (Kanasaki, Haruhiko)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：10325053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アクチピンは視床下部mHypoA-55細胞のKiss-1発現を増加させた。アクチピン結合蛋白であるフォリスタチンは単独でmHypoA-55細胞のKiss-1発現を減少させた。アクチピンによるKiss-1発現の増加はフォリスタチン存在下で阻害された。卵胞期に卵胞からの分泌が上昇するインヒビンBはmHypoA-55細胞のKiss-1発現に影響を与えず、黄体期に上昇するインヒビンAはKiss-1発現を有意に減少させた。アクチピンのKiss-1増加作用はインヒビンA存在下で阻害された。mHypoA-55細胞におけるインヒビンサブユニット発現はエストラジオールで増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性の月経周期は視床下部-下垂体-性腺軸により精巧に調節されているが、体重の増減や過度な運動、ストレスの存在などにより簡単に破綻する。視床下部-下垂体-性腺軸の頂点に存在するとされる脳内キスペプチンニューロンの制御機構を知ることが、女性内分泌の詳細を解き明かす手掛かりになると思われる。

研究成果の概要(英文)：In the mHypoA-55 ARC cells, activin significantly increased Kiss-1 gene expression. Follistatin alone reduced Kiss-1 expression within these cells. Interestingly, activin-induced Kiss-1 gene expression was completely abolished by follistatin. Inhibin A, but not inhibin B reduced Kiss-1 expression. Activin-increased Kiss-1 expression was also abolished by inhibin A. Pretreatment of the cells with follistatin or inhibin A significantly inhibited kisspeptin- or GnRH-induced Kiss-1 gene expression in mHypoA-55 cells. The subunits that compose activin and inhibin, as well as follistatin were expressed in mHypoA-55 cells. We found that expression of the inhibin &#61537; subunit and follistatin genes was modulated in the presence of E2 in mHypoA-55 ARC cells.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：月経異常 女性内分泌 生殖内分泌 キスペプチン

## 1. 研究開始当初の背景

生殖に関する女性の内分泌機能は HPG axis により制御されている。HPG axis が正常に機能することは至適時期での思春期発来及び初経発来をもたらす、その機能が正常に維持されることは生殖可能年齢の女性における月経周期の確立と妊孕性の獲得に不可欠である。2003 年に低ゴナドトロピン性性腺機能低下症患者の家系より GPR54 (後のキスペプチン受容体) の遺伝子変異が見つかり、このリガンドである「キスペプチン」が生殖機能維持に重要であることが発見された (PNAS 100:10972-10976, 2013, NEJM 349:1614-1627, 2013)。これ以降、GnRH を頂点とした従来の HPG axis の概念は大きく変化し、視床下部キスペプチンニューロンが最上位に位置して HPG axis を統制しているのではないかと考えられている。キスペプチンをコードする Kiss-1 遺伝子を発現するキスペプチンニューロンはげっ歯類においては 2 つの異なる視床下部領域に局在する。視床下部弓状核 (ARC) 領域に局在するキスペプチンニューロンは GnRH のパルス状分泌を維持する役割をもつ。この領域のキスペプチンニューロンは KNDy ニューロンとも呼ばれ、キスペプチンの他にニューロキニン B (NKB) とダイノルフィン A (Dyn A) 共発現している。同部位の Kiss-1 発現は性腺摘出により増加し、エストラジオール (E2) の投与で減少することがことから、E2 によるネガティブフィードバックの中枢ではないかと考えられている。一方、視床下部前腹側周囲核 (AVPV) 領域に存在するキスペプチンニューロンは NKB、Dyn A を共発現しておらず、同領域の Kiss-1 発現は E2 の投与で増加する。このことから、AVPV 領域に局在するキスペプチンニューロンは E2 による GnRH/LH サージを惹起するポジティブフィードバック機構に関係しているのではと考えられている。しかし、ARC 領域のキスペプチンニューロンがどのようなメカニズムで GnRH パルス発生に関与するのか、なぜ E2 に反応して Kiss-1 発現を減少させるのか、反対になぜ AVPV 領域のキスペプチンニューロンは E2 に反応して Kiss-1 発現を増加させるのか、そのメカニズムは分かっていない。また、生体内において E2 によるフィードバック機構をキスペプチンニューロンのみが単独で担っているのか、あるいはキスペプチンニューロンに影響を与える他の因子が関与するのかが不明である。

卵胞液中から同定されたアクチビン、インヒビン、フォリスタチンは卵巣局所で卵胞発育に関与すると考えられている。またこれらは下垂体前葉にも存在し、ゴナドトロフからの FSH 分泌に重要な役割を担っていると考えられている (Mol Endocrinol 17: 318-332, 2003)。アクチビン、インヒビン及びフォリスタチン遺伝子は中枢神経系にも存在することが報告されている (JCEM 78: 1521-1524, 1994)。

## 2. 研究の目的

視床下部 ARC と AVPV の 2 つの部位に局在するキスペプチンニューロンの E2 に対する反応がなぜ異なるのか、またそれぞれの領域のキスペプチンニューロンはどのような神経的あるいは内分泌的な影響を受けるのか、その詳細は依然不明である。今回私達は卵巣局所因子として知られるアクチビン、インヒビン、フォリスタチンが中枢神経系に存在することから、これらの因子が HPG axis の最上位にあるキスペプチンニューロンに影響を与えるかどうか、またアクチビン、インヒビン、フォリスタチンが E2 の影響を受けるか否かに注目して研究を行った。

## 3. 研究の方法

マウス視床下部弓状核 (ARC) 領域由来の Kiss-1 発現ニューロンである mHypoA-55 細胞を用いた。ARC 領域の Kiss-1 ニューロンはエストラジオールによるネガティブフィードバックのターゲットとされ、本細胞は E2 刺激によりある条件下では Kiss-1 発現が減少する。アクチビン、インヒビン及びフォリスタチン刺激による mHypoA-55 細胞における Kiss-1 発現を定量 PCR で測定した。

## 4. 研究成果

mHypoA-55 細胞をアクチビン A で刺激するとキスペプチンをコードする Kiss-1 遺伝子及びキスペプチン発現は有意に増加した。一方、mHypoA-55 細胞をフォリスタチンで刺激すると、Kiss-1 遺伝子及びキスペプチン発現は有意に減少することが分かった。一方インヒビン A は Kiss-1 遺伝子発現を抑制したが、インヒビン B に抑制効果は認められなかった。またアクチビンによる Kiss-1 遺伝子発現はフォリスタチン及びインヒビン A の存在下で抑制された。これらの結果は視床下部キスペプチンも、卵巣局所因子であるアクチビン、インヒビン、フォリスタチンによる制御を受けている可能性を示唆している。mHypoA-55 細胞にはインヒビン、inhibin、 $\beta$ A、 $\beta$ B サブユニットの他、フォリスタチンも発現することが分かった。これらのサブユニット発現は E2 の存在下で増加した<sup>1)</sup>。脳内にもインヒビン、inhibin、 $\beta$ A、 $\beta$ B サブユニット及びフォリ

スタチンの発現がある事が分かっている。これまで卵巢及び下垂体の局所因子として HPG axis に関与するとされてきたアクチビン、インヒビン、フォリスタチンは E2 の制御下に脳内において GnRH 制御因子であるキスペプチンニューロンを制御している可能性がある。このことは脳内のアクチビン/インヒビン/フォリスタチンが E2 によるフィードバック機構に関与している可能性を示している。

1) Z. Tumurgan, H. Kanasaki, T. Tumurbaatar, A. Oride, H. Okada, T. Hara, S. Kyo, Role of activin, follistatin, and inhibin in the regulation of Kiss-1 gene expression in hypothalamic cell modelsdagger, Biol Reprod, 101 (2019) 405-415.

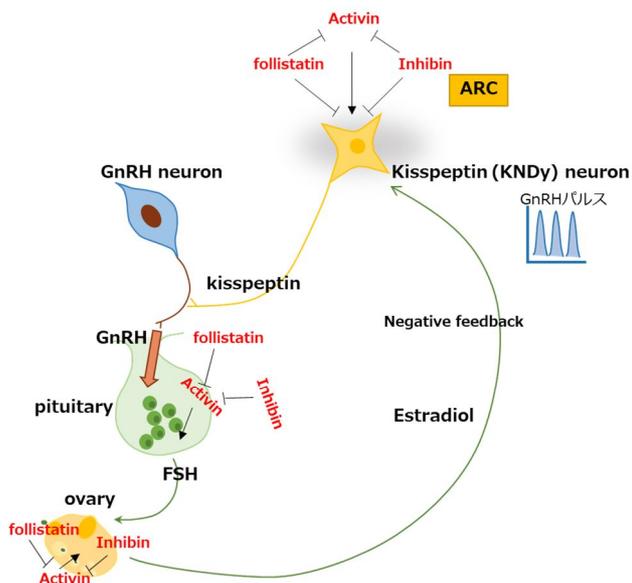


図 HPG axisにおけるアクチビン/インヒビン/フォリスタチン

卵巢局所因子として発見されたアクチビン/インヒビン/フォリスタチンは下垂体前葉でFSH合成分泌に関与する他、視床下部キスペプチンニューロンの制御を行っている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanasaki H, Tumurbaatar T, Oride A et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of RFRP-3 in the Regulation of Kiss-1 Gene Expression in the AVPV Hypothalamic Cell Model mHypoA-50	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Sci	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1933719118813456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tumurbaatar T, Kanasaki H, Oride A et al.	4. 巻 270
2. 論文標題 Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the regulation of hypothalamic kisspeptin expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gen Com Endocrinol	6. 最初と最後の頁 60-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2018.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara T, Kanasaki H, Oride A et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 Role of kisspeptin and Kiss1R in the regulation of prolactin gene expression in rat somatolactotroph GH3 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine	6. 最初と最後の頁 101-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12020-018-1759-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oride A, Kanasaki H, Kyo S	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in modulating hypothalamic-pituitary system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 234-241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tumurbaatar T, Kanasaki H, Oride A et al.	4. 巻 99
2. 論文標題 Action of neurotensin, corticotropin-releasing hormone, and RFamide-related peptide-3 in E2-induced negative feedback control: studies using a mouse arcuate nucleus hypothalamic cell model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 1216-1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iory145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanasaki H, Tumurbaatar T, Oride A, Hara T, Okada H, Kyo S	4. 巻 16
2. 論文標題 Gamma-aminobutyric acidA receptor agonist, muscimol, increases KiSS-1 gene expression in hypothalamic cell models.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol	6. 最初と最後の頁 386-391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12061.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oride A, Kanasaki H, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Hara T, Tumurbaatar T, Kyo S.	4. 巻 97
2. 論文標題 GLP-1 increases Kiss-1 mRNA expression in kisspeptin-expressing neuronal cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 240-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iox087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mijiddorj T, Kanasaki H, Oride A, Hara T, Sukhbaatar U, Tumurbaatar T, Kyo S.	4. 巻 96
2. 論文標題 Interaction between kisspeptin and adenylate cyclase-activating polypeptide 1 on the expression of pituitary gonadotropin subunits: a study using mouse pituitary lbeta2 cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Reprod	6. 最初と最後の頁 1043-1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iox030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanasaki H, Tselmeg M, Oride A, Sukhbaatar U, Hara T, Kyo S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Pulsatile kisspeptin effectively stimulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gynecol Endocrinol	6. 最初と最後の頁 721-727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09513590.2017.1318277.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Sukhbaatar U, Kyo S.	4. 巻 247
2. 論文標題 How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol	6. 最初と最後の頁 138-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcn.2017.01.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	折出 亜希  (Aki Oride)  (00423278)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師    (15201)	